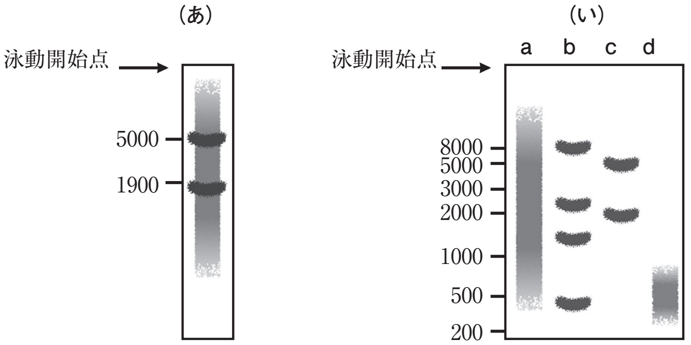
第６講　細胞増殖とタンパク質

大学４年生の京太君は，ある研究室に配属され，細胞の増殖に関わるタンパク質Ｈについて研究することになった。

実験１：京太君は，正常細胞からRNAを抽出後，数百から数千ヌクレオチドを分離できる電気泳動法によりRNAを分離し，染色した（**図１**の(あ)）。電気泳動法ではヌクレオチド数が大きいものほど，泳動開始点からの移動距離が小さい。5000ヌクレオチドおよび1900ヌクレオチド付近の顕著なバンドはリボソームRNAである。タンパク質をコードする伝令RNAは，分子量の大きいものから小さいものまで，中間程度のものを中心に連続的な分布を示す。伝令RNAが連続したアデニンヌクレオチドを終末にもつことを利用し，①連続したチミンヌクレオチドをもつプライマーを用いて逆転写酵素により相補的なDNAを合成した。



図中の左の数字はヌクレオチド数を表す

図１

問１　下線部①について，合成されたDNAの電気泳動結果として最もふさわしいものはどれか。**図１**の(い)のレーン**a**～**d**の中から選べ。また，選んだ理由について解答欄の枠の範囲内で記述せよ。

実験２：続いて京太君は，189 個のアミノ酸からなるタンパク質 H の，②開始コドン（アミノ酸番号１）から終止コドンまでをコードする DNA（図２）を得るために，21 ヌクレオチドのプライマーを設計し，前述の相補的な DNA を鋳型として PCR により増幅した。得られた DNA がコードするタンパク質を発現させるために，この DNA を発現プラスミドに組み込んだ。DNA 配列を確認したところ，組み込まれた DNA は正常なタンパク質 H をコードすることが明らかとなった。

アミノ酸番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	…
DNA 配列	ATG	ACG	GAA	TAT	AAG	CTG	GTG	GTG	GTG	GGC	GCC	GGC	GCC	…

…	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	終止
…	GGC	CCC	GGC	TGC	ATG	AGC	TGC	AAG	TGT	GTG	CTC	TCC	TGA

図２

問２　下線部②について，用いたプライマーの配列を以下の(ア)～(ク)の中から２つ選べ。

(ア)　GTGCTGAAGTATGAAACGATG
(イ)　TACTGCCTTATATTCGACCAC
(ウ)　ATGACGGAATATAAGCTGGTG
(エ)　CACCAGCTTATATTCCGTCAT
(オ)　TGCAAGTGTGTGCTCTCCTGA
(カ)　GCACTTACACACGAGGGATCA
(キ)　TCAGGAGAGCACACACTTGCA
(ク)　AGTCCTCTCGTGTGTGAACGT

実験３：あるがん細胞の細胞株を材料に実験１および２と同様の実験を行い，得られた遺伝子 H の DNA を発現プラスミドに組み込んだ。得られたプラスミド 20 個の DNA 配列を解析したところ，③正常遺伝子 H と１塩基変異の入った遺伝子 H_A に由来する DNA をもつプラスミドがおおよそ１対１の比率で得られた。

問３　下線部③について，比率がおおよそ１対１となった理由を解答欄の枠の範囲内で記述せよ。

マウス由来のある細胞（以下, テスト細胞）は, 培養ペトリ皿いっぱいに単層の細胞シートを形成すると増殖を止める。遺伝子 H の作るタンパク質 H は，いくつかのステップを経て，タンパク質 M のリン酸化を促進する（**図３**の(う)）。実験１～３で得た遺伝子 H もしくは遺伝子 H_A の発現プラスミドをこのテスト細胞に導入し，2 週間後に培養ペトリ皿の観察を行うと，遺伝子 H の発現プラスミドを導入したテスト細胞の培養ペトリ皿には単層の細胞シートのみが観察される。一方，遺伝子 H_A の発現プラスミドを導入したテスト細胞の培養ペトリ皿には，単層の細胞シートの上にがん細胞のような細胞が積み重なった細胞集塊が多数観察される（**図３**の(え)）。ただし, 発現プラスミドの導入効率とそれによって発現するタンパク質の量に差はない。

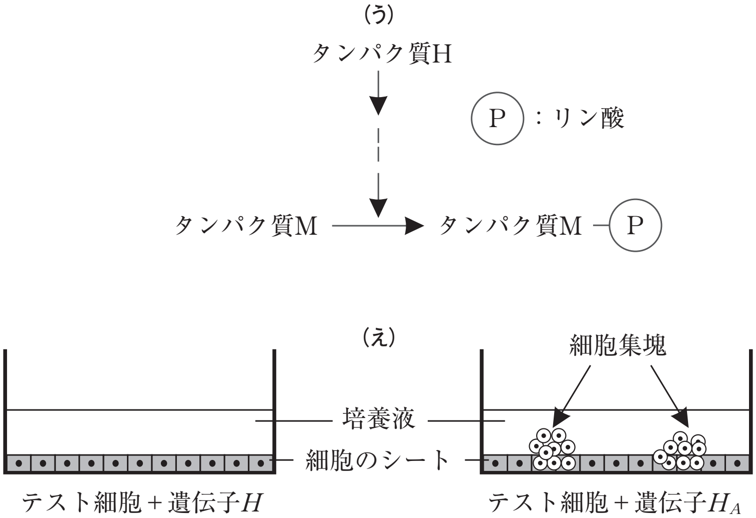


図3

京太君は，遺伝子 H_A の変異に加えて，別の場所に変異の入った遺伝子 H_{AB} と，それとは別の場所に変異の入った遺伝子 H_{AC} の発現プラスミドをおのおの作製した。各遺伝子から発現されるタンパク質をここでまとめると，遺伝子 H からは正常タンパク質 H，遺伝子 H_A からは１アミノ酸が変異している変異タンパク質 $\mathrm{H_A}$ が発現される。また，遺伝子 H_{AB}，H_{AC} からは，$\mathrm{H_A}$ に加えてさらに１アミノ酸が変異している変異タンパク質 $\mathrm{H_{AB}}$，$\mathrm{H_{AC}}$ がそれぞれ発現される。これらのタンパク質の機能にはタンパク質 I およびタンパク質 J との結合が重要である。タンパク質 $\mathrm{H_A}$ は，タンパク質 I，タンパク質 J のどちらとも結合するが，タンパク質 I とタンパク質 J の両方と同時に結合することはできない。一方，タンパク質 $\mathrm{H_{AB}}$ はタンパク質 I とのみ結合し，$\mathrm{H_{AC}}$ はタンパク質 J とのみ結合する。また，テスト細胞にはタンパク質 I とタンパク質 J は十分量発現している。

実験４：京太君は，テスト細胞に発現プラスミドを導入し，正常タンパク質Ｈおよび変異タンパク質 H_A，H_{AB}，H_{AC} をそれぞれ発現させた後に，リン酸化されたタンパク質Ｍの量を測定した。そして，正常なタンパク質Ｈを発現させたときのリン酸化されたタンパク質Ｍの細胞あたりの量を１とし，変異タンパク質 H_A，H_{AB}，H_{AC} を発現させたときのリン酸化されたタンパク質Ｍの量比を求めた。また，H，H_A，H_{AB}，H_{AC} を発現させたときの培養ペトリ皿内に形成された細胞集塊の数を数えた。両方の結果をまとめたものが**表１**である。

表１

テスト細胞に発現させたタンパク質	リン酸化されたタンパク質Ｍの量	形成された細胞集塊の数
正常タンパク質Ｈ	1	0
変異タンパク質 H_A	10	100
変異タンパク質 H_{AB}	8	5
変異タンパク質 H_{AC}	1	3

問４　タンパク質Ｍのリン酸化の促進に関わるタンパク質はＩとＪのどちらと考えられるか選べ。また，その理由を解答欄の枠の範囲内で記述せよ。

実験5：**表1**のように変異タンパク質H_{AB}あるいはH_{AC}を発現させたときの細胞集塊の数は，変異タンパク質H_Aを発現させたときに比べてかなり少なかった。そこで次に，京太君は2つの変異タンパク質H_{AB}とH_{AC}を同時に発現させる実験を行った。④その結果，変異タンパク質H_Aを発現させたときに匹敵する数の細胞集塊が形成された。

問5　下線部④について，変異タンパク質H_Aを発現させたときに匹敵する数の細胞集塊が形成された理由を，タンパク質H_A，タンパク質I，タンパク質J，結合，という4つの語句をそれぞれ少なくとも1回用いて解答欄の枠の範囲内で記述せよ。ただし，タンパク質H，H_A，H_{AB}，H_{AC}の発現量の差による影響はないものとする。

実験6：京太君は，タンパク質Mのリン酸化を阻害する薬剤Zの存在を知った。京太君は，この薬剤Zを用いることで遺伝子H_Aによって形成される細胞集塊の数を抑制できるのではないかと考え，実験4で行った変異タンパク質H_Aを発現させるときに薬剤Zを同時に加え，2週間後に培養ペトリ皿を観察した。すると細胞集塊が形成されないだけでなく，テスト細胞も増殖せず単層の細胞シートも形成されていなかった。

問6　テスト細胞を正常細胞，細胞集塊をがん細胞と考えたとき，実験6の結果から，薬剤Zを抗がん剤として用いる場合に生じる問題点を**表1**の結果を踏まえて解答欄の枠の範囲内で記述せよ。ただし，薬剤Zはタンパク質Mのリン酸化を阻害する作用のみをもつものとする。

第６講

問１　a

理由…連続した分布をもつ伝令 RNA から逆転写酵素により合成された相補的な DNA には，鋳型となった伝令 RNA の長さも反映されているため，同様に連続した分布をもつ DNA となる。

問２　(ウ)，(キ)

問３　がん細胞は遺伝子 H と遺伝子 H_A のヘテロ接合体と考えられ，それぞれの遺伝子座から同程度の転写が行われたため。

問４　タンパク質 I

理由…タンパク質 I と結合できる $\mathrm{H_A}$ や $\mathrm{H_{AB}}$ の遺伝子を発現プラスミドで導入したテスト細胞でのみタンパク質 M のリン酸化が促進されているため。

問５　タンパク質 $\mathrm{H_A}$ がタンパク質 I と結合するとタンパク質 M のリン酸化が促進され，タンパク質 $\mathrm{H_A}$ とタンパク質 J が結合すると細胞集塊の形成が促進される。したがって，タンパク質 $\mathrm{H_{AB}}$ と $\mathrm{H_{AC}}$ が同時に発現すればタンパク質 $\mathrm{H_A}$ と同様に細胞集塊の形成が促進される。

問６　タンパク質 M のリン酸化は正常細胞の増殖にも必要であり，薬剤 Z を用いることによってリン酸化が阻害されると，がん細胞だけでなく正常細胞の増殖も抑えられてしまう。